东亚飞蝗胚胎体节的形成过程

何正波*，李廷景，陈　斌
（重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所，重庆 400047）

摘要：体节形成是昆虫胚胎发育过程中的关键问题。东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*（Meyen）是一种重要的农业害虫，其体节形成的时序过程尚无详细报道。本研究采用免疫组化和品红染色方法研究了室内人工饲养东亚飞蝗的体节形成过程。结果表明：完成受精后，细胞核开始分裂并向卵表面迁移。细胞核到达卵表面的时间有差异，卵后端的表面最先出现细胞核。卵后端腹面的细胞分裂旺盛，在此处形成胚盘。胚盘分化成原头和原躯干 2 个部分，随后形成前头部、颌部、胸部和腹部等区域。到产卵后 50 h，胸部区域首先开始分节，向前依次形成颌部和前头部体节，一次形成 1 个或几个体节，向后依次形成腹部体节，一次形成 1 个腹节。所有体节在 44 h 内形成，包括 3 个前头部体节，3 个颌部体节，3 个胸节和 10 个腹节。研究结果进一步证实东亚飞蝗是以胸部为中心进行体节形成的，属于典型的短胚带昆虫；不同蝗虫的胚胎发育速率不一样，但体节形成模式完全一致，形成体节所需要的相对时间也一样。
关键词：东亚飞蝗；胚胎发育；体节形成；免疫组化；碱性品红染色
中图分类号：Q964　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)01-0050-06

Segmentation process during embryogenesis in *Locusta migratoria manilensis* (Orthoptera: Acrididae)

HE Zheng-Bo*, LI Ting-Jing, CHEN Bin (Institute of Insect & Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: Segmentation is critical to insect embryogenesis, yet little is known about this process in *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) which is an important pest. In this study, the spatio-temporal process of segmentation in *L. migratoria manilensis* was observed by using immunohistochemical and fuchsin staining methods. The results showed that the zygote nucleus quickly divided and migrated to the egg periphery after fertilization, and then the nuclei were condensing at the posterior end of the egg where a circular blastodisc formed. The blastodisc subsequently differentiated into head lobe and posterior germband. With elongation of the germband, the first segment was observed at thoracic region at about 50 h after egg laid, and then other segments, including 3 head segments, 3 gnathal segments, 3 thoracic segments, and 10 abdominal segments, gradually formed in a sequential pattern within 44 h. The thoracic and gnathal regions were added one or more segments at a time, while only one segment at a time was formed for the abdomen. Our results further confirmed that *L. migratoria manilensis* is a classic short germband insect with the anterior thoracic region as the morphological differentiation center. Meanwhile, the developmental rates of embryo vary among different locust species, while the segmentation patterns and the relative time required for segmentation are identical.
Key words: *Locusta migratoria manilensis*; embryogenesis; segmentation; immunohistochemical staining; fuchsin staining

昆虫身体模式(body plan)的建成主要是在胚胎发育过程中完成的。昆虫胚胎发育分为长胚带、中胚带和短胚带 3 种类型。在长胚带昆虫中，所有的体节在囊胚期就已经决定，而在短胚带昆虫中，在囊胚期只决定胚胎前部的部分体节，大部分的体节是随着胚带伸长而逐渐形成的(Liu and Kaufman, 2005)。另外，长胚带昆虫体节的形成是在合胞体环境中形成，而短胚带昆虫的大部分体节是在细胞化胚胎中形成的。长胚带类型见于进化上较为高等的完全变态昆虫，而短胚带类型被认为是一种较为原始的发育类型，大多数节肢动物的胚胎发育都属于短胚带模式(Liu and Kaufman, 2005)。在脊椎动物中，胚胎也

基金项目：国家自然科学基金项目(30700435)；重庆市自然科学基金项目(2009BB1387)；重庆市教委科学技术研究项目(KJ100617)
作者简介：何正波，男，1977 年 9 月生，四川巴中人，博士，副教授，研究方向为昆虫发育生物学
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhengbohe@yahoo.com.cn
收稿日期 Received: 2010-09-15；接受日期 Accepted: 2010-12-19

采用与短胚带昆虫类似的由前向后逐渐形成的模式，说明脊椎动物和节肢动物的胚胎形成过程中可能具有相同的分子机理(Schröder *et al.*, 2008)。

黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 胚胎发育属于典型的长胚带类型，其体节形成的分子调控机理已经研究得很清楚。但果蝇是进化上非常高等的昆虫，生命周期较短，形态结构也有很多特化，其身体模式建成过程中的某些事件不适合于其他昆虫，如头部体节的形成、附肢的形成等(Schröder *et al.*, 2008)。因此，研究其他昆虫，尤其是低等短胚带昆虫的体节形成过程及其分子机理逐渐成为进化发育生物学的热点。

蝗虫胚胎发育是典型的短胚带发育模式，在系统发育上又是较低等的渐变态昆虫。其中有些种是重要的农牧业害虫，同时又是重要的模式物种，如东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen)和沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 等。东亚飞蝗的室内饲养体系较为成熟，产卵量高，卵大，胚胎操作容易，而且东亚飞蝗胚胎、若虫和成虫等时期的基因功能研究技术体系已成功建立(He *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2007)。因此，东亚飞蝗是研究低等短胚带昆虫胚胎发育的理想材料。作为进化发育生物学的模式物种，弄清其胚胎的体节形成过程是进一步研究其身体模式形成分子机理的基础。沙漠蝗 *S. gregaria* 的胚胎发育和体节形成过程已有详细报道(Patel *et al.*, 1989a; Ho *et al.*, 1997)。非洲飞蝗 *L. migratoria migratorioide* 和东亚飞蝗的胚胎发育过程也有详细研究，但对其体节形成的时序过程报道不详(Roonwal, 1936; 钦俊德等, 1954)。本研究采用免疫组化和品红染色方法研究了东亚飞蝗的体节形成过程，为进一步研究东亚飞蝗体节形成的分子机理以及预测预报等方面提供依据。

1　材料与方法

1.1　实验昆虫

东亚飞蝗，室内饲养种群，光照周期 12L:12D。东亚飞蝗的卵在 30℃ 保湿培养条件下约经 13 d 孵化。胚胎的发育用产卵后(after egg laid, AEL)的时间来描述，以刚产下的卵记为 0 h AEL。

1.2　主要试剂

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。Engrailed 单克隆抗体 4D9 购自 Developmental Studies Hybridoma Bank。AP 底物显色试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司，其他试剂均为国产试剂。

1.3　胚胎免疫组织化学染色

蝗虫交尾后收集其卵块，置于 29℃ 保湿恒温培养，每隔 1 h 取样 1 次。胚胎的收集、制备和免疫组化染色方法参照何正波等(2009)方法进行。

1.4　胚胎碱性品红染色

将蝗虫卵在固定液 A［1:1 (v/v)的庚烷和 10% 的甲醛］中固定 45 min，去除庚烷和固定液，用 100% 的甲醇洗涤 3 次，每次 10 min；加入固定液 B［20:2.5:1 (v/v)的 95% 乙醇、冰乙酸和 37% 甲醛］，再固定 1 h；用 70% 乙醇洗涤 4 次，每次 10 min；加入 2 mol/L 的 HCl 于 60℃ 保温 10 min，用水洗涤 1 次，70% 乙醇洗涤 2 次，每次 10 min；加入碱性品红染色液(5 mg/mL 碱性品红的 80% 乙醇溶液)和 10 μL 浓 HCl，轻摇 30 min；用 95% 的乙醇洗涤卵，直到没有红色释放为止；在 100% 的乙醇中脱水后，加入 1:1 (v/v)比例混合的 Benz Mix［4:1 (v/v)的苯甲酸苄酯和苯甲醇］和无水乙醇。

1.5　显微观察

免疫组化和品红染色完成后，用 Nikon SMZ1500 体式显微镜观察并照相，图像采集为 Nikon Nis elements BR 3.0 软件。

2　结果

2.1　东亚飞蝗的早期胚胎发育

东亚飞蝗卵宽约 1.33 ± 0.05 mm，长约 6.28 ± 0.01 mm。飞蝗精卵细胞核在产卵后 1 – 2 h 内结合，合子核位于卵后端的卵黄中。合子核形成后不久就开始不断的分裂，但不细胞化；到 10 h AEL 左右，细胞核开始向卵表面移动(钦俊德等, 1954)。14 h AEL 时，少数细胞核到达卵后端的表面(图版 Ⅰ：A, B)，而卵中部和前部表面还没有细胞核出现(图版 Ⅰ：C)；到 22 h AEL 时，卵的近中部已开始出现细胞核，后端的细胞核较为密集(图版 Ⅰ：D)，随后卵后端腹面的细胞分裂特别迅速，形成致密的细胞层，该处将形成胚盘(图版 Ⅰ：E, F)；到 32 h AEL 时，胚盘形成，略呈圆形，位于卵的后端。42 h AEL 时，胚盘已分为原头和原躯干 2 部分(图版 Ⅰ：G, H)，原躯干沿腹面延伸，46 h AEL 时原躯干为原头长的 2 倍，原头位于卵的后端，原躯干位于卵的腹面，略与原头成直角(图版 Ⅰ：I, J)；第 3 天早期的时候，胚胎已经分为原头、颌部、胸和腹部 4 部分，胸部开始分节，原头依然位于卵的后端(图版 Ⅰ：K)；第 4 天胚胎的原头离开卵的后

端，向前端移动(图版Ⅰ：L)，此时胚胎的体节全部形成(图版Ⅰ：M)。

2.2　东亚飞蝗胚胎体节形成过程

用4D9单克隆抗体检测了100个左右不同发育时期的胚胎，发育期为产卵后30 h到第5天早期的胚胎。产卵后46 h时，原躯干为原头长的2倍左右，但还没有形成分节(图版Ⅱ：A)。到50 h AEL时，在胸部区域开始形成分节，最先形成的是第1胸节(T1)和第2胸节(T2)，而第3胸节(T3)刚刚开始形成(图版Ⅱ：B)。胸部体节形成后，颌部开始分节，56 h AEL时颌部的上颚(Mn)形成(图版Ⅱ：C)，59 h AEL时触角节(An)和下唇(Lb)形成(图版Ⅱ：D)。到62 h AEL，颌部的下颚(Mx)和腹部的第1腹节(A1)形成(图版Ⅱ：E)，65 h AEL时前头部的间插节(Ic)和腹部的第2腹节(A2)形成(图版Ⅱ：F)，77 h AEL时已形成第6腹节(A6)(图版Ⅱ：G)，第7腹节(A7)在80 h AEL形成(图版Ⅱ：H)，第10腹节(A10)形成稍晚，到94 h AEL时形成(图版Ⅱ：I)。

2.3　东亚飞蝗胚胎体节形成顺序

根据 *engrailed* 表达条带出现的先后顺序可以推导出东亚飞蝗体节形成的顺序：最先形成 T1 和 T2，紧接着形成 T3，然后向前依次形成上颚、视节、触角节、下唇、下颚和间插节，向后依次形成腹部第1～10个腹节(图1)。说明东亚飞蝗体节形成以胸部为中心，然后向前和向后逐渐形成其余的体节，进一步证实东亚飞蝗是以胸部区域为中心进行形态建成的，属于典型的短胚带昆虫。

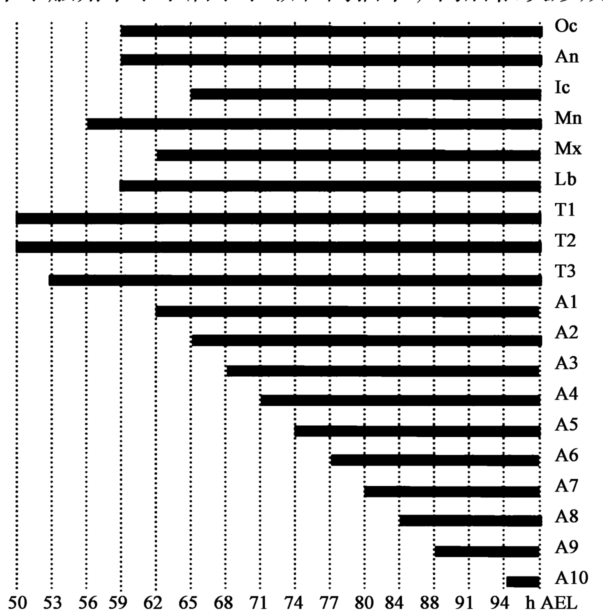


图1　东亚飞蝗体节的形成时间和形成顺序

Fig. 1　Appearance and timing of the segments in *Locusta migratoria manilensis* embryo

Oc：视节 Ocular；An：触角 Antenna；Mn：上颚 Mandible；Mx：下颚 Maxilla；Lb：下唇 Labium；Ic：间插节 Intercalary；T：胸节 Thoracic segment；A：腹节 Abdominal segment；AEL：After egg laid.

3　讨论

蝗虫卵受精后，精卵细胞核融合形成的合子核位于卵后端的卵黄中央，合子核随后开始有丝分裂，形成的子核不细胞化，而是以活质体的形式向卵表面和卵前端移动(Ho *et al*., 1997)。细胞核到达卵表面的时间有差异，沙漠蝗的卵后端表面在14 h AEL时开始出现细胞核，42 h AEL时卵的前端才出现细胞核(Ho *et al*., 1997)；东亚飞蝗在14 h AEL时卵后端表面出现细胞核(图版Ⅰ：A，B)，22 h AEL时卵中部开始出现细胞核(图版Ⅰ：D)。细胞核的细胞化过程也是不同步的，部分细胞核在移动过程中即开始细胞化，其余细胞核在到达卵表面后才完成细胞化，形成细胞化的囊胚层(Ho *et al*., 1997)。与蝗虫一样，家蚕早期胚胎发育的细胞核迁移和细胞化过程也是不同步的，细胞核首先到达前极，并随即进行细胞化，而此时后极的细胞核还未完全到达卵的周缘(Nagy *et al*., 1994)。然而，果蝇细胞核的迁移和细胞化过程是基本同步的，细胞核迁移到卵的周缘形成合胞体囊胚层，合胞体囊胚层中的细胞核被卵细胞膜内折包裹而形成细胞化的囊胚层。

果蝇 *engrailed* 基因编码含同源框的转录因子，与体节形成有关(Kornberg, 1981；Kornberg *et al*., 1985)。*engrailed* 在节肢动物中非常保守(Peel *et al*., 2006)，在体节的后部边界表达，可以作为体节标记基因而用于节肢动物体节形成过程的研究(Patel *et al*., 1989a, 1989b；Patel, 1994)。Patel 等(1989a)用 Engrailed 单克隆抗体进行免疫组化染色，详细研究了 *engrailed* 在沙漠蝗胚胎发育过程中的表达模式和沙漠蝗的体节形成过程。东亚飞蝗 *engrailed* 的表达模式和表达顺序与沙漠蝗完全一致，仅形成时间和速率不一样。在50 h AEL时开始出现 *engrailed* 表达条带(图版Ⅱ：B)，94 h AEL时第10腹节的表达条带开始形成(图版Ⅱ：H)。因此，东亚飞蝗在44 h内形成所有的体节，包括前头部的视节、触角节和间插节，颌部的上颚、下颚和下唇，胸部第1～3节，腹部第1～10节。头、胸部一次形成1个体节或几个体节，而腹节一次仅形成1节，形成1个体节的时间约需要3 h；第10腹节形成的时间稍微滞后，即第9腹节形成后约6 h

才形成(图 1)。另外，*engrailed* 在早期视节的表达呈小的圆斑状而易与背景混淆，到 65 h AEL 开始呈带状而变得清晰可见(图版Ⅱ：F)，沙漠蝗的视节与触角和下唇同时形成(Patel *et al.*, 1989a)。因此，本研究将东亚飞蝗视节形成的时间定在了 59 h AEL。

东亚飞蝗卵在 29℃ 保湿恒温培养条件下完成胚胎发育平均需要 13 d，体节形成的时间为 44 h，占整个胚胎发育过程的 14%。沙漠蝗在 32℃ 条件下，胚胎发育的时间为 20 d，体节形成的时间为 67.2 h，占整个胚胎发育过程的时间也为 14% (Patel *et al.*, 1989a)。说明不同蝗虫完成胚胎发育的时间不一致，但完成体节发育的相对时间是一样的。

沙漠蝗囊胚层形成前，分裂核已开始细胞化(Ho *et al.*, 1997)。因此，蝗虫体节是在细胞化环境中形成的，而果蝇所有的体节是在合胞体环境中形成。体节的形成是通过母体基因和分节基因等基因群的级联调控实现的，分节基因包括间隙基因、对控基因、体节极性基因和同源异型基因(St Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992; Rivera-Poma and Jackle, 1996; Davis and Patel, 2002)。母体基因和分节基因编码转录因子，这些转录因子在果蝇的合胞体环境中可以自由扩散，而在蝗虫细胞化的胚层中，转录因子的扩散受到限制，使得分节基因在蝗虫和果蝇中的表达和调控模式存在差异。例如，对控基因 *even-skipped* 和 *fushi tarazu* 在沙漠蝗中不是以对控模式表达(Patel *et al.*, 1992; Dawes *et al.*, 1994)。因此，深入研究东亚飞蝗体节形成基因的表达模式和功能，并与果蝇等高等长胚带昆虫的相应基因进行比较，对于体节基因的功能进化和昆虫胚胎的演化等进化发育生物学问题具有重要的意义。

参 考 文 献 (References)

Chin CT, Chai CH, Sha CY, 1954. Studies on the locust egg Ⅰ: morphological changes of the embryo during egg incubation, with special reference to the developmental stages of the eggs collected from the field (Acrididae: Orthoptera). *Acta Entomologica Sinica*, 4(4): 383－398. [钦俊德，翟启慧，沙槎云，1954. 蝗卵的研究，Ⅰ. 东亚飞蝗蝗卵孵育期中胚胎形态变化的观察及野外蝗卵胚胎发育期的调查. 昆虫学报，4(4): 383－398]

Davis GK, Patel NH, 2002. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 669－699.

Dawes R, Dawson I, Falciani F, Tear G, Akam M, 1994. *Dax*, a locust Hox gene related to *fushi-tarazu* but showing no pair-rule expression. *Development*, 120: 1561－1572.

He Zb, Cao YQ, Yin YP, Wang ZK, Chen B, Peng GX, Xia YX, 2006. Role of *hunchback* in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. *Develop. Growth Differ.*, 48: 439－445.

He ZB, Chen B, Cao YQ, Cai ZH, Feng GZ, Li TJ, Xia YX, 2009. Expression of *hunchback* during oogenesis and embryogenesis in *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Science China C: Life Sciences*, 39(6): 559－566. [何正波，陈斌，曹月青，蔡志华，冯国忠，李廷景，夏玉先，2009. 东亚飞蝗 *hunchback* 基因在卵子形成和胚胎发育过程中的原位表达. 中国科学 C 辑：生命科学，39(6): 559－566]

Ho K, Dunin-Borkowski OM, Akam M, 1997. Cellularization in locust embryos occurs before blastoderm formation. *Development*, 124: 2761－2768.

Kornberg T, 1981. *Engrailed*: a gene controlling compartment and segment formation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1095－1099.

Kornberg T, Siden I, O'Farrell P, Simon M, 1985. The *engrailed* locus of *Drosophila*: *in situ* localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell*, 40: 45－53.

Liu PZ, Kaufman TC, 2005. Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. *Evolution & Development*, 7(6): 629－646.

Nagy L, Riddiford L, Kiguchi K, 1994. Morphogenesis in the early embryo of the lepidopteran *Bombyx mori*. *Dev. Biol.*, 165: 137－151.

Patel NH, 1994. Developmental evolution: insights from studies of insect segmentation. *Science*, 266: 581－590.

Patel NH, Ball EE, Goodman CS, 1992. Changing role of *evenskipped* during the evolution of insect pattern formation. *Nature*, 357: 339－342.

Patel NH, Kornberg TB, Goodman CS, 1989a. Expression of *engrailed* during segmentation in grasshopper and crayfish. *Development*, 107: 201－212.

Patel NH, Martin-Blanco E, Coleman KG, Poole SJ, Ellis MC, Kornberg TB, Goodman CS, 1989b. Expression of *engrailed* proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell*, 58: 955－968.

Peel AD, Telford MJ, Akam M, 2006. The evolution of hexapod *engrailed*-family genes: evidence for conservation and concerted evolution. *Proc. Biol. Sci.*, 273(1595): 1733－1742.

Rivera-Pomar R, Jackle H, 1996. From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet.*, 12(11): 478－483.

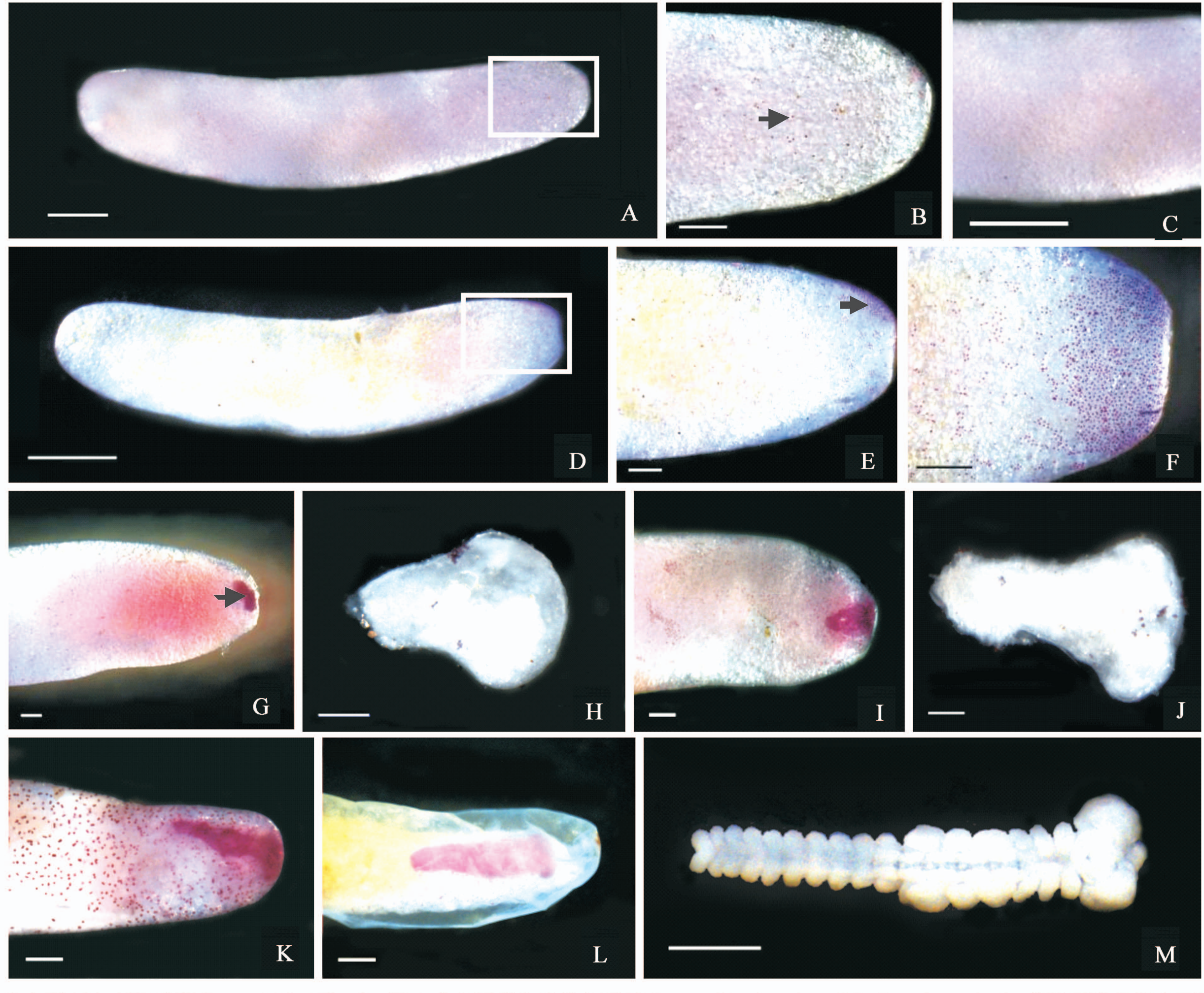
Roonwal ML, 1936. Studies on the embryology of the African migratory locust *Locusta migratoria migratoroides*. 1. Early development with a new theory of multiphased gastrulation among insects. *Phil. Trans. Roy. Soc. B*, 226: 391－421.

Schröder R, Beermann A, Wittkopp N, Lutz R, 2008. From development to biodiversity－*Tribolium castaneum*, an insect model organism for short germband development. *Dev. Genes Evol.*, 218: 119－126.

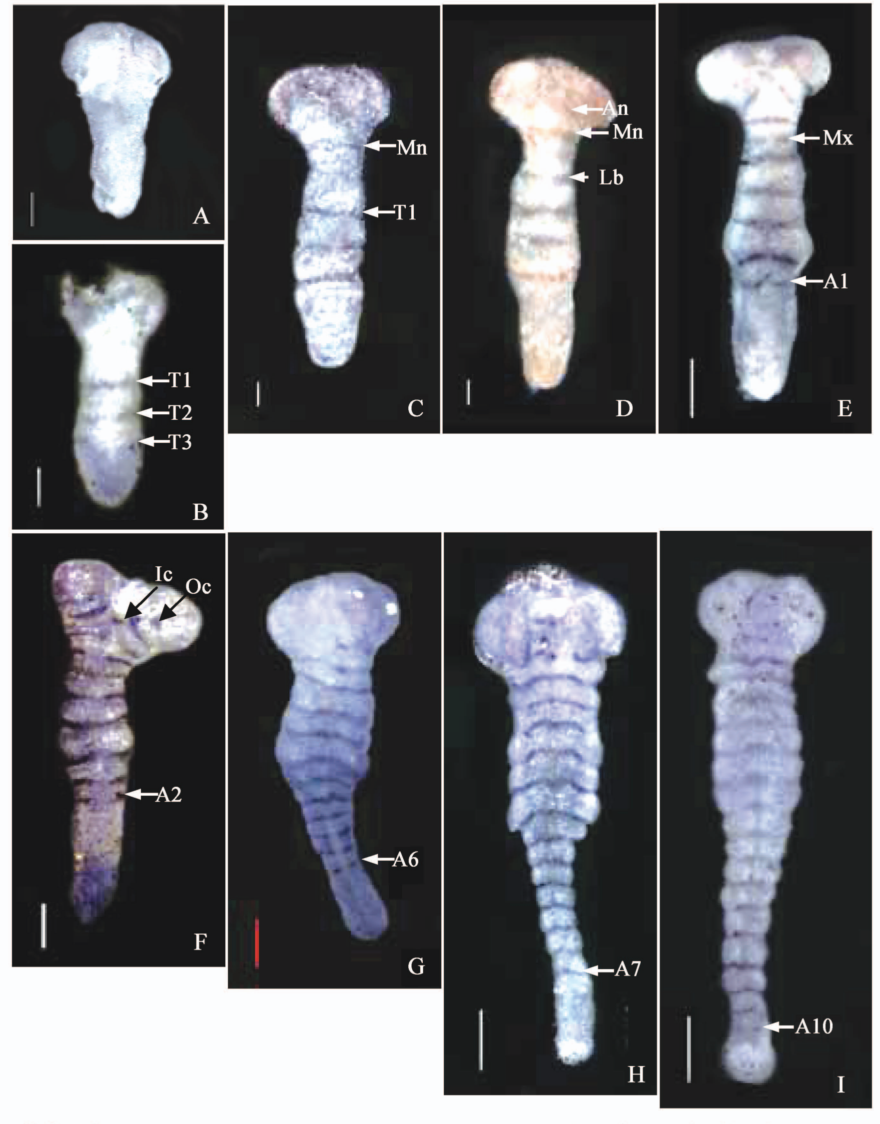
St Johnston D, Nüsslein-Volhard C, 1992. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 68: 201－219.

Wei Z, Yin YP, Zhang BS, Wang ZK, Peng GX, Cao YQ, Xia YX, 2007. Cloning of a novel protease required for the molting of *Locusta migratoria manilensis*. *Develop. Growth Differ.*, 49(7): 611－621.

(责任编辑：袁德成)



A：发育到 14 h AEL 的卵 Egg at 14 h AEL；B：图 A 中方框部位的放大照 High-magnification view of the boxed area in A，箭头示卵后端表面的细胞核 Arrowhead indicates the nucleus at the egg periphery；C：图 A 中卵中部的放大图 High-magnification view of the middle part in A；D：发育到 42 h AEL 的卵 Egg at 42 h AEL；E. 图 D 中方框部位的侧面放大照 High-magnification lateral view of the boxed area in D，箭头示卵后极腹部细胞密集之处 Arrowhead indicates the place where the nuclei are condensing；F：图 D 中方框部位的腹面放大照 The ventral close view of the boxed area in D；G：发育到 42 h AEL 的卵，箭头示位于卵后级的胚胎 Arrowhead indicates the embryo at posterior end of the egg at 42 h AEL；H：从卵中解剖出来的胚胎，时期与 G 一致 The embryo dissected from the egg which has same stage with the egg in G；I：发育到 46 h AEL 的卵，躯干与原头成直角 The germband forms a right angle to the head lobe at 46 h AEL；J：从卵中解剖出来的胚胎，时期与 I 一致 The embryo dissected from the egg which is at the same stage with the egg in I；K：发育到第 3 天早期的卵，躯干延长，但原头仍与躯干成直角 The germband continues elongating，but still at a right angle to the head lobe as before at the early stage in the 3rd day AEL；L：发育到第 4 天的卵，原头离开卵的后端向前端移动 The embryo moves towards the anterior part at the 4th day AEL；M：全部体节已经形成，与 L 同时期的胚胎 All segments have formed at the 4th day AEL. A，B，D，E，F，G，I，K，L 卵后极向右 The posterior is to the right in A，B，D，E，F，G，I，K and L；H，J，M 胚胎头部向右 The anterior is to the right in H，J and M. AEL：产卵后 After egg laid；标尺 Scale bars：A，C，D：1 mm；B，G，I：500 μm；E，F，K，L，M：250 μm；H：200 μm；J：100 μm.



A：46 h AEL 的胚胎，无体节形成 At 46 h AEL, no segments are visible；B：50 h AEL 的胚胎，T3 刚开始形成 T3 is just beginning to form at 50 h AEL；C：56 h AEL 的胚胎，颌部 Mn 形成 The Mn is appearing at 56 h AEL；D：59 h AEL 的胚胎，An 和 Lb 形成 The An and Lb are forming at 59 h AEL；E：62 h AEL 的胚胎，颌部的 Mx 和腹部 A1 形成 The maxilla and A1 are forming at 62 h AEL；F：65 h AEL 的胚胎，前头部的 Ic 和腹部的 A2 形成 The Ic and A2 are forming at 65 h AEL；G：77 h AEL 的胚胎，腹部 A6 形成 The A6 appears at 77 h AEL；H：80 h AEL 的胚胎，腹部 A7 形成 The A7 forms at 80 h AEL；I：94 h AEL 的胚胎，腹部 A10 形成 The A10 appears at 94 h AEL；胚胎头部朝上 Anterior is at the top. AEL：产卵后 After egg laid. 缩写 Abbreviations：An：触角 Antenna；Mn：上颚 Mandible；Mx：下颚 Maxilla；Lb：下唇 Labium；Ic：间插节 Intercalary；Oc：视节 Ocular；T：胸节 Thoracic segment；A：腹节 Abdominal segment. 标尺 Scale bars：A，B，C，D：100 μm；E，F，G，H，I：250 μm.